

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 1/28, H05H 3/04, G01N 15/14	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/29354 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. August 1997 (14.08.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/00361	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 28. Januar 1997 (28.01.97)		
(30) Prioritätsdaten: 196 03 996.7 5. Februar 1996 (05.02.96) DE 196 16 216.5 23. April 1996 (23.04.96) DE	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); D-51368 Leverkusen (DE). P.A.L.M. GMBH (DE/DE); Sudetenstrasse 22, D-82515 Wolfratshausen (DE).		
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): DIESSEL, Edgar [DE/DE]; Suevenstrasse 9, D-50679 Köln (DE). STEBANI, Jürgen [DE/DE]; Doerperhofstrasse 39, D-47800 Krefeld (DE). REIHS, Karsten [DE/DE]; Suevenstrasse 9, D-50679 Köln (DE). SCHÜTZE, Karin [DE/DE]; Sudetenstrasse 22, D-82515 Wolfratshausen (DE). SCHÜTZE, Raimund [DE/DE]; Sudetenstrasse 22, D-82515 Wolfratshausen (DE).		
(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, D-51368 Leverkusen (DE).		

(54) Title: **PROCESS AND DEVICE FOR SORTING AND FOR EXTRACTION OF BIOLOGICAL OBJECTS ARRANGED ON PLANAR MEANS, SUCH AS BIOLOGICAL CELLS OR CELL ORGANELLES, HISTOLOGICAL SECTIONS, CHROMOSOME PARTICLES ETC. USING LASER BEAMS**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM SORTIEREN UND ZUR GEWINNUNG VON PLANAR AUSGEBRACHTEN BIOLOGISCHEM OBJEKten WIE BIOLOGISCHE ZELLEN BZW. ZELLORGANELLEN, HISTOLOGISCHEN SCHNITTEN, CHROMOSOMENTEILCHEN ETC. MIT LASERSTRÄHLEN**

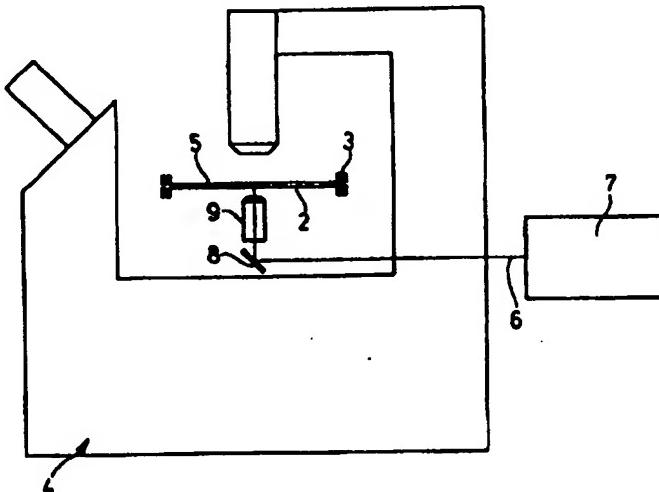
(57) Abstract

The invention relates to a process and device for sorting and extraction of biological objects on a planar slide (2). The field of an object or the object itself which is on the slide (2) is dissected using a laser beam (6) and transferred by a laser-induced conveying process to a collector substrate (5) arranged directly above or below the slide. During dissection, the object is driven around by the laser beam (6) in a closed curve or is cut directly and automatically from the slide (2), said operation being controlled by computer. This process can be used to separate and sort individual objects selected from a very large number of objects. The process can also be used to separate specific cells from tissue sections.

(57) Zusammenfassung

Bei dem Verfahren und der Vorrichtung zum Sortieren und zur Gewinnung von biologischen Objekten auf einem planaren Träger (2) wird ein Objektfeld oder das Objekt selbst, das sich auf dem Träger (2)

befindet, mit einem Laserstrahl (6) ausgeschnitten und durch einen Laser-induzierten Transportprozess auf ein unmittelbar oberhalb oder unterhalb des Trägers angeordnetes Auffangsubstrat (5) übertragen. Beim Ausschneidevorgang wird das Objekt vom Laserstrahl (6) entweder in einer geschlossenen Kurve umfahren oder es wird computergesteuert selbst unmittelbar aus dem Träger (2) herausgeschnitten. Mit diesem Verfahren können aus einer sehr großen Zahl von Objekten einzelne ausgewählte Objekte räumlich abgetrennt und ausgesondert werden. Das Verfahren kann auch zur Separation von spezifischen Zellen aus Gewebeabschnitten eingesetzt werden.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estonland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauritanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verfahren und Vorrichtung zum Sortieren und zur Gewinnung von planar ausgebrachten biologischen Objekten wie biologische Zellen bzw. Zellorganelle, histologischen Schnitten, Chromosomenteilchen etc. mit Laserstrahlen

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Sortieren und zur Gewinnung einzelner biologischer Objekte. Die Objekte sind hierbei auf einem festen planaren Träger nebeneinander angeordnet. Mit diesem Verfahren können aus einer sehr großen Zahl von Objekten (z.B. 10^5 bis 10^9) einzelne Objekte räumlich abgetrennt und ausgesondert werden. Die Abtrennung von gehäuften Zellen als Gesamt-
10 einheit ist ebenso möglich. Ebenso kann das Verfahren zur Separation von spezifischen Zellen aus Gewebeschnitten eingesetzt werden. Voraussetzung für dieses Sortierverfahren ist die vorherige Erkennung und Selektion der betreffenden Objekte aufgrund spezifischer Eigenschaften (z.B. durch Färbung, Fluoreszenzmarkierung oder durch radioaktive Markierung). Unter „biologischen Objekten“ werden im Rahmen
15 der vorliegenden Anmeldung vor allem lebende oder fixierte biologische Zellen oder Zellbestandteile verstanden.

Zur Separation einzelner biologischer Objekte lassen sich Objekte mit optischen Methoden, wie der optischen Pinzette (Optical Tweezer) in einer wäßrigen Lösung bewegen (K. Schütze, A. Clement-Sengewald, Nature, 667 (Vol. 368) 1994). Aufgrund der geringen Kraftübertragung ist diese Methode auf Objekte beschränkt, die sich frei in der Lösung bewegen können. Da sich die sortierten wie die unsortierten Objekte in der gleichen Lösung befinden, ist eine getrennte Kultivierung nur mit zusätzlichem Aufwand erzielbar. Für eine getrennte Kultivierung müssen diese Zellen mit einer anderen Methode wie z.B. mit Mikrokapillaren abgetrennt bzw. abgesaugt werden. Adhärenz wachsende Zellen oder fixierte Zellen auf einem Schnittpräparat können mit feinen Nadeln, die über Mikromanipulatoren bewegt werden, separiert werden. Hierbei werden die Zellen direkt berührt und könnten somit mechanisch belastet werden. Zudem besteht die Gefahr der Kontamination durch ungewolltes Zellmaterial. Beide Methoden sind verhältnismäßig zeitintensiv, so daß sie nicht zur Bearbeitung einer Vielzahl von Objekten geeignet sind.
20
25
30

Zur Separierung einzelner Zellen aus einer großen Zahl ($>10^6$) in einer Flüssigkeit dispergierter, biologischer Objekte geeignete Trenn- bzw. Sortierapparate sind kommerziell erhältlich. Während bei der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS = Fluorescence activated Cell Sorter) elektrostatische Prinzipien zur räumlichen Separation zum Einsatz kommen, arbeitet der magnetisch aktivierte Zellsortierer (MACS = Magnetic activated Cell Sorter) mit magnetischen Kräften. Hierbei liegen die Zellen jedoch nicht auf einem planaren Träger nebeneinander. Überdies haben beide Methoden den Nachteil, daß sich manche Objekte nur eingeschränkt (FACS) oder überhaupt nicht getrennt voneinander absondern lassen (MACS).

10

Die vorgestellten Methoden können keine einzelnen Zellen aus einem Zellverband wie etwa einem Gewebe oder aus histologischen Gewebepräparaten lösen.

15

Ferner sind unter dem Namen „Ablative Photodecomposition“ Verfahren bekannt, bei denen mit gepulsten UV-Lasern, insbesondere mit Excimer-Lasern, ein gezielter Materialabtrag bei Polymeren erfolgt. Diese Verfahren können im weitesten Sinne als Ätzverfahren angesehen werden. Ein ähnliches Verfahren, bei dem jedoch ein kontinuierlich betriebener UV-Laser verwendet wird, wird in dem US-Patent 5 211 805 beschrieben. Dieses Verfahren soll sich zur industriellen Bearbeitung von technischen Polymeren und zur biomedizinischen Behandlung von biologischem Gewebe eignen. Hiermit ist ein Sortierprinzip verwandt, das mit Laserstrahlen die auf einem Träger befindlichen unerwünschten biologischen Objekte mit hohen Strahlungsdosen zerstört, während die selektierten (erwünschten) Objekte zurück bleiben (US 4 624 915). Dieser Prozeß ist verhältnismäßig aufwendig, um einzelne Objekte aus großen Populationen zu selektieren.

20

25

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht in der räumlichen Separation einzelner biologischer Objekte, die nebeneinander auf einem festen planaren Träger wie z.B. einer polymeren Trägerfolie ausgebracht sind. Hierbei soll der Vorgang des Absonderns möglichst kurz (<10 s) und berührungslos, z.B. in abgetrennten, sterilen Kammern, durchführbar sein. Außerdem soll der Prozeß sehr zuverlässig und damit in einfacher Weise automatisierbar sein. Gleichzeitig soll die Überlebensfähigkeit bzw. die Morphologie der biologischen Objekte in der Regel gewährleistet bleiben; d.h. die

30

biologischen Objekte sollen durch den Abtrennprozeß nicht geschädigt bzw. beeinträchtigt werden.

Diese Aufgabe wird erfundungsgemäß dadurch gelöst, daß ein Objektfeld der
5 Trägerfolie, auf dem sich das selektierte biologische Objekt bzw. der histologische Schnitt befindet, mit einem Laserstrahl ausgeschnitten wird und durch einen laserinduzierten Transportprozeß auf ein unmittelbar oberhalb oder unterhalb der Trägerfolie angeordnetes Auffängersubstrat übertragen wird. Die erfundungsgemäße Lösung besteht also darin, daß die biologischen Objekte in einem dem Präparat angepaßten,
10 z.B. auch kreisförmigen Umfeld mitsamt dem Träger von einem Laserstrahl ausgeschnitten werden und anschließend aus der Trägerfolie heraus auf einen in der Nähe angebrachten Auffänger geschleudert werden. Es wurde beobachtet, daß die herausgetrennten Objektfelder dabei stets in Richtung des Laserstrahls beschleunigt werden. Eine physikalische Erklärung für diesen laserinduzierten Transportprozeß liegt möglicherweise in dem photokinetischen Impuls, der von dem Laserstrahl auf das ausgeschnittene Objektfeld übertragen wird und damit für die Beschleunigung verantwortlich ist. Die räumliche Separation der biologischen Objekte beruht also bei diesem
15 Prozeß auf dem Ausschneiden der gewünschten Objektfelder mit den vorher selektierten Objekten und ihrem Abtransport zu einem in der Nähe befindlichen Auffänger-
20 substrat.

- Das Ausschneiden des Objektfeldes kann vorteilhaft in der Weise erfolgen, daß der Laserstrahl durch eine Relativbewegung von Laserstrahl und Trägerfolie auf einer geschlossenen, das Objektfeld einschließenden Kurve um das biologische Objekt herumgeführt wird. Alternativ kann aber die Abtrennung eines Objektfeldes in Analogie zu einem Stanzprozeß auch so durchgeführt werden, daß der das Objektfeld einschließende Schnittbereich durch eine mit dem Laserstrahl beleuchtete, auf die Trägerfolie abgebildete Schlitzmaske simultan belichtet wird.
- 30 Wie schon erwähnt, soll das Auffängersubstrat in unmittelbarer Nähe der Trägerfolie angeordnet werden, so daß die Transportwege bei dem Separationsprozeß kurz sind. Gute Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Entfernung 0,5 bis 10 mm, vorzugsweise 1 bis 3 mm, betrug.

Der Durchmesser des Objektfeldes mit dem selektierten Objekt kann aufgrund des außerordentlich präzisen Schnittvorgangs sehr klein, d.h. in einem Bereich von 10 µm bis 20 µm, gewählt werden.

5

Zum Ausschneiden wird vorzugsweise ein UV-Laser verwendet, wobei der Laserstrahl fokussiert auf der Trägerfolie abgebildet wird.

Die Trägerfolie besteht dabei aus einer UV-absorbierenden Polymerfolie mit einer Dicke zwischen 5 µm und 15 µm, deren Absorptionsverhalten an die Wellenlänge des UV-Lasers angepaßt ist, also zumindest in der Umgebung der Laserwellenlänge ein Absorptionsmaximum besitzt. Als besonders geeignet haben sich Polymerfolien erwiesen, die mindestens 5 Gew.-% eines aromatischen oder teilaromatischen Polykondensats enthalten. Die geometrische Form des Auffängersubstrats ist relativ unkritisch. Geeignet ist z.B. eine relativ dicke Folie oder Platte, die im Abstand von 0,5 bis 10 mm oberhalb oder unterhalb von der Trägerfolie parallel dazu angebracht wird. Das Auffängersubstrat kann aber auch als topfförmiger Behälter ausgebildet sein. Insbesondere werden Mikrozentrifugenbehälter empfohlen, wie sie in der Molekularbiologie verwendet werden, z.B. eine Mikrotiterplatte mit 90 bis 500 Vertiefungen (Wells).

Gemäß einer speziellen Ausführungsform ist die Platte oder Folie mit einer adhäsiven Schicht versehen. Durch eine solche Klebeschicht können die abgeschleuderten Objektfelder auf dem Auffängersubstrat fixiert werden.

25

Zur Erkennung und Selektion der gewünschten biologischen Objekte auf der Trägerfolie kann vorzugsweise die Methode der Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt werden.

30

Alternativ können die biologischen Objekte mit Hilfe bekannter histochemischer Faroreaktionen oder morphologischer visuell wahrnehmbarer Veränderungen erkannt und anschließend selektiert werden.

Gemäß einer Weiterentwicklung werden die biologischen Objekte mit einem flüssigen, für die Laserstrahlung durchsichtigen Nähr- oder Puffermedium beschichtet. Unter dieser Bedingung können selektierte Objektfelder erfindungsgemäß ausgeschnitten und abgelöst werden.

5

Das erfindungsgemäße Separierverfahren wird vorteilhaft in einem abgeschlossenen System durchgeführt. Zu diesem Zweck wird sowohl die Trägerfolie mit den zu sortierenden Objekten, als auch das Auffängersubstrat in einem geschlossenen Behälter untergebracht, der ein UV-transparentes Fenster für den Laserstrahl besitzt.

10

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Zeichnungen und Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Es zeigen:

15

- Fig. 1 schematisch eine Trägerfolie mit adhärennten Bakterien,
- Fig. 2 den prinzipiellen Aufbau einer Apparatur zur Realisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens,
- Fig. 3/4 das zugrundeliegende Sortierprinzip,
- 20 Fig. 5/6 den Aufbau mit aufrechtem/inversem Mikroskop und
- Fig. 7 das Ablegen des Objektes in einem Auffanggefäß.

25

Fig. 1 zeigt beispielsweise eine Bakterienpopulation 1, die planar auf einer 5 µm starken Polyarylatfolie 2 (Trägerfolie) ausgebracht ist. Zum Sortievorgang wird die Trägerfolie 2 in einen Schiebetisch 3 eingelegt und mechanisch fixiert. Dieser Tisch befindet sich gemäß Fig. 2 als Objektisch in einem inversen Mikroskop 4 und kann z.B. mittels eines computergesteuerten Schrittmotors in x,y-Richtung (Horizontalebene) positioniert werden. Im Schiebetisch 3 ist ferner gegenüber der Trägerfolie 2 im Abstand von 1,8 mm ein plattenförmiges Auffängersubstrat 5 gehalten. Bei einer Bewegung des Schiebetisches 3 werden also gleichzeitig die Trägerfolie 2 und das Auffängersubstrat 5 senkrecht zum Strahlengang (z-Richtung) im Mikroskop verschoben. Der Schiebetisch 3 mit der Trägerfolie 2 und den darauf befindlichen biologischen Objekten 1, sowie das Auffängersubstrat 5 sind von einem geschlossenen

30

Gehäuse mit einem UV-durchlässigen Fenster für den Laserstrahl umgeben (nicht dargestellt), so daß das Verfahren in einem hermetisch abgeschlossenen System durchgeführt werden kann.

- 5 Als Trägerfolie für die biologischen Objekte wird eine 5 µm bis 15 µm dicke, UV-absorbierende Polymerfolie aus einem Polymer verwendet, das mindestens 5 Gew.-% eines aromatischen oder teilaromatischen Polykondensates, wie z.B. Polycarbonate, Polyurethane, Polyarylate, Copolyester, Polyestercarbonate oder Blends aus diesen Polykondensaten und anderen Thermoplasten enthält. Andersartige Folien sind in diesem Zusammenhang denkbar.
- 10

- Zur räumlichen Trennung z.B. einer einzelnen Bakterie aus der ausgebrachten Population wird ein UV-Laserstrahl 6 der Wellenlänge 337 nm eines gepulsten N₂-Lasers 7 verwendet. Der Laser 7 liefert bei einer maximalen Pulsfrequenz von 20 Hz ca. 300 µJ Strahlenergie. Geeignet sind auch andere gepulst oder kontinuierlich arbeitende Laser wie z.B. Excimerlaser mit einer Wellenlänge von 193, 248 oder 308 nm oder ein frequenzvervierfachter Nd:YAG-Laser mit einer Wellenlänge von 266 nm oder ein frequenzverdoppelter Ar-Ionenlaser mit Wellenlängen von 244 nm oder 257 nm. Der Laserstrahl 6 wird über einen dielektrischen Strahlteiler 8 und ein verkleinerndes Mikroskopobjekt 9 (Verkleinerung 63 x, Öffnungsverhältnis NA = 0.9, oder auch andere Objektive) auf die Trägerfolie 2 punktförmig abgebildet. Dieser Punkt hat einen Durchmesser von mindestens 1 µm.
- 15
- 20

- Eine kreisförmige bzw. geschlossene Schnittlinie mit einem Durchmesser von z.B. 10 µm wird um das selektierte Bakterium durch eine entsprechende Bewegung des Schiebetisches 3 in der Horizontalebene erzeugt. Die durch die Schnittlinie definierte Fläche stellt in diesem Fall die Objektfläche dar. Der Laserstrahl bleibt während des nachfolgend beschriebenen Schneidprozesses ortsfest.
- 25

- 30 Im Experiment betrug die relative Bahngeschwindigkeit des Laserstrahls zum Ausschneiden einer geschlossenen Fläche 5 µm/s. Dabei entstand eine scharfkantige, eng begrenzte Schnittlinie, wobei gleichzeitig mit der Rückkehr des Laserstrahls zum Startpunkt der Schnittlinie ein Abriß der ausgeschnittenen Fläche erfolgte. Die Fläche

wurde nun durch einen laserinduzierten Transportprozeß, dessen physikalische Wirkungsweise im Einzelnen noch nicht geklärt ist, von der Trägerfolie 2 weg auf das darüber befindliche, mit einer adhäsiven Klebeschicht versehene Auffängersubstrat 5 geschleudert und blieb dort haften. Eine andere Möglichkeit besteht darin, als Auffängersubstrat eine handelsübliche Mikrotiterplatte mit z.B. 96 Wells zu verwenden. Unter „Wells“ werden in der pharmazeutischen Forschung die in der Mikrotiterplatte befindlichen Aussparungen bzw. kreisrunden Vertiefungen zur Probenaufnahme mit einem Durchmesser von ca. 4 mm und einer Tiefe von ca. 6 mm verstanden.

10

Der Sortierprozeß soll noch einmal anhand der Figuren 3 und 4 veranschaulicht werden. Figur 3 zeigt ein räumlich zu separierendes Bakterium 10 auf der Trägerfolie 2. Auf Grund der kreisförmigen Bewegung des Schiebetisches 3 ist durch den ortsfesten Laserstrahl 6 beim Schneidprozeß bereits eine Schnittlinie 11 von etwa 5 bis 15 7 µm Breite in die Folie 2 geschrieben worden. Die Schnittbreite ist bedingt durch das Absorptionsverhalten der Folie. In diesem Bereich ist das Folienmaterial komplett abgetragen worden. Unmittelbar nachdem die Schnittlinie 11 zu einem geschlossenen Kreis vervollständigt worden ist, wird das abgetrennte Folienstück (Objektfeld) 12 mit dem darauf befindlichen Bakterium 10 in Richtung des Laserstrahls beschleunigt und wie in Fig. 4 dargestellt, auf das Klebeband 5 (Auffängersubstrat) geschleudert. In der Trägerfolie 2 verbleibt ein kreisrundes Loch 13.

20

Anstelle des Schiebetisches kann auch mit einem ruhenden Objektisch gearbeitet und der Laserstrahl mit Hilfe eines in die Laseroptik eingebrachten geeigneten optischen Ablenkelements auf einem Kreis um das selektierte Bakterium herumgeführt werden.

25

Voraussetzung für die Laser-Separation ist die vorherige Erkennung und Selektion der aus der Trägerfolie zu entfernenden Objektfelder. Eine in der pharmakologischen Forschung häufig angewandte Methode der Erkennung und Selektion von bestimmten Zellstrukturen ist die Fluoreszenzspektroskopie. Zu diesem Zweck wird ein kommerziell erhältliches Fluoreszenz-Mikroskop eingesetzt. Grundlage ist dabei, daß die für die Selektion vorgesehenen Zellen bzw. Bakterien ein signifikantes Fluoreszenzsignal erzeugen, das als Unterscheidungskriterium herangezogen wird. Mit Hilfe eines mit

30

einem Suchalgorithmus ausgestatteten Scanprogramms kann dann der Schiebetisch 3 so gesteuert werden, daß automatisch nacheinander die Bereiche mit selektierten Bakterien als Objektfelder zentral im Gesichtsfeld des Fluoreszenzmikroskops positioniert und anschließend ausgeschnitten werden.

5

Zur Erkennung von biologischen Objekten in Gewebeschnitten können auch die bekannten histologischen Farbreaktionen oder im Mikroskop wahrnehmbare morphologische Veränderungen herangezogen werden.

- 10 Die Trägerfolie 2 kann auch mit einer für die Laserstrahlung durchlässigen Nähr- oder Pufferlösung, z.B. einer PBS-Pufferlösung, beschichtet werden.

- 15 Gemäß einer Weiterentwicklung des Verfahrens kann die Lösung der Aufgabe dadurch erreicht werden, daß der Lichtdruck des Laserstrahls nun dafür verwendet werden soll, das gewünschte Partikel bzw. biologische Objekt selbst unmittelbar von der Oberfläche des festen planaren Trägers (Objektträger oder Petrischale) wegzuakzentuiertieren und in einem geeigneten Gefäß aufzufangen, d.h. die Separierung eines biologischen Objektes ist also auch mit oder ohne gleichzeitiges Herauslösen bzw. Herausschneiden des das biologische Objekt tragenden Bereiches der Trägerfolie möglich. Dies geschieht nach der Weiterentwicklung in der folgenden Weise, die anhand der beiliegenden Figuren 5 bis 7 erläutert werden soll.

- 20 Bei Verwendung eines aufrechten Mikroskopes 14 gemäß Figur 5 wird ein geeigneter Objektträger 2 (Dicke ca. 170 µm) umgekehrt auf die Aufnahmehalterung 15 eines speziell für die Lasermikromanipulation entwickelten Mikroskopisches 3 gelegt, d.h. das biologische Objekt 10 befindet sich auf der Unterseite des Objektträgers 2. Bei dem Objekt handelt es sich z.B. um histologische Gewebeschnitte von wenigen µm Dicke, oder um adherierende Chromosomen- bzw. DNA-Präparate.

- 25 30 Der Mikroskopisch 3 ist für eine Verschiebung in 2 (für x/y Bewegung) oder 3 Achsen (für x/y/z Bewegung) ausgelegt und mit einer Aufnahmeverrichtung 15 für z.B. Objektträger 2 oder Petrischälchen versehen. Der Tisch 3 ist also über geeignete Antriebe motorisiert, die computergesteuert in bekannter Weise, z.B. über eine Com-

putermaus (oder Joystick), bewegt werden können. Die hybriden Schrittmotoren der Achsen-Antriebe arbeiten mit einer hohen Präzision. Der kleinste Schritt beträgt 20 nm, der maximale Verfahrweg des Mikroskopisches 3 kann bis zu mehreren Zentimetern (z.B. 10 cm) betragen. Die Präzision zum Wiederauffinden gespeicherter Punkte ist <400 nm. Es können Geschwindigkeiten zum Verfahren des Mikroskopisches von wenigen μm bis zu mehreren mm pro Sekunde gewählt werden. Mit einem sog. Framegrabber wird das über eine Videokamera aufgezeichnete, aktuelle Mikroskopbild auf einen Monitor gegeben und kann mit Computerfunktionen, z.B. Befehlsfunktionen, Steuerzeichen, Kontrollmarken etc., graphisch überlagert werden (Video-Overlay).

Für Lasermikromanipulation geeignet sind nur dünne Objektträger (ca. 170 μm dick) oder Petrischalen mit dünner (ca. 25 μm), gasdurchlässiger Folie (sog. Petriperm-Schälchen). Da für die Lasermikromanipulation im Nanometer-Bereich hohe Anforderungen an eine präzise Probenhalterung und Probenführung gestellt werden, wurde die Aufnahmehalterung 15 speziell konfiguriert: Bei den dünnen Objektträgern 2 besteht die Gefahr, daß sie sich z.B. bei Verwendung von Öl-Immersions-Objektiven leicht durchbiegen und somit keine gute Fokussierung erreicht werden kann. Um dies zu vermeiden, muß der Objektträger 2 an mindestens 3 Seiten der Halterungen aufliegen, wobei nur die beiden schmalen Seiten des Objektträgers 2 mit je einer Federklammer festgeklemmt werden können. Eine weitere Notwendigkeit, speziell für die Lasermikroskopie, ist die exakte Justierbarkeit des Probenhalters (Objektträger 2 oder Aufnahmehalterung 15). Es muß gewährleistet sein, daß die Probe immer im gleichen Abstand zur Spitze des Objektivs 9 liegt, und zwar im gesamten Verfahrbereich des Trägers (ca. 5 bis 10 cm).

Zuerst werden geeignete biologische Objekte 10 mit einer kleineren Vergrößerung lichtoptisch ausgewählt. Sobald alle interessanten Objekte im Computer gespeichert sind, wechselt man zu einem höhervergrößernden Objektiv. Den durch den Objektivwechsel bedingten Strahlversatz (chromatische Abberation) gleicht man durch eine Korrekturfunktion an einem gespeicherten Wert aus, die dann automatisch auf alle gespeicherten Punkte übertragen wird.

Der Computer verfährt nun zu dem ersten Objekt 10. Das von einer Videokamera aufgezeichnete Mikroskopbild wird auf dem in den Figuren nicht gezeigten Computermonitor dargestellt. Ein Marker auf dem Monitor zeigt die Position des Laserstrahlfokus an. Die Mikroskopbühne wird entweder per Hand (über Maus oder Joystick kontrolliert) bewegt oder fährt automatisch durch ein Computerprogramm gesteuert nach vorgegebenem Muster im wesentlichen kreis- oder spiralförmig um das gewählte Objekt 10 herum. Der „Marker“ auf dem Monitor kann als „Stift“ betrachtet werden, mit dem die Kontur des gewünschten biologischen Objektes nachgezeichnet wird. Wenn gleichzeitig der Laser mit einer Pulsfrequenz von ca. 15 bis 20 Hz feuert, wird alles Material, das sich in der Schußlinie im Bereich des „Marker“ befindet, abgetragen bzw. zerstört. Der extrem fokussierte Laserstrahl „zeichnet“ eine feine Linie von ca. 500 nm Breite rund um das gewünschte Objekt 10 und trennt es somit von seiner Umgebung. Bei Zellen im histologischen Schnitt löst sich durch diese Prozedur die gewünschte Zelle vom Zellverband und lockert sich vom Untergrund in Gestalt des durch die Schnittlinie gegebenen Objektfeldes. Durch das oben erwähnte spiralförmige Umrunden der ausgewählten Zielzelle kann der freigelaserte Bereich rund um die Zelle vergrößert werden.

Bei dem hier verwendeten Laser handelt es sich z.B. um einen gepulsten, kompakten Stickstofflaser von hoher Strahlqualität (Wellenlänge: 337 nm, Pulsdauer: 3 nsec, Pulsfrequenz: von 10 bis 30 Hertz). Andere Laser sind auch denkbar, sofern die verwendete Laserwellenlänge das biologische Material nicht negativ beeinflußt. Der Laserstrahl selbst bzw. seine Quelle bleibt vorzugsweise unbeweglich. Allerdings kann der Laser auch in x/y Richtung mit einem Radius von mehreren µm relativ zur Objektebene bewegt werden, d.h. letztendlich ist nur wichtig, daß Laserstrahl und Objektebene (Mikroskopisch) relativ zueinander bewegt werden.

Das auf diese Weise freipräparierte Objekt kann nun schneller und sicherer als im Stand der Technik (etwa mit einer Nadel) und vor allem berührungslos, d.h. wenn nötig auch völlig steril, mit einem weiteren, gezielten Laserschuß automatisch in ein Probengefäß hinein katapultiert werden (Flugbahn 17).

Dazu ist es notwendig, daß eine zweite Aufnahmehalterung 16 (z.B. um ein Auffanggefäß 18 oder eine Mikrotiterplatte einzuspannen) über zwei motorisierte und computergesteuerte Achsen so unter die erste Aufnahmehalterung 15 verfahren wird, daß das per Laser freipräparierte Objekt 10 genau über dem Auffanggefäß 18 plaziert wird. Hier ist ebenfalls eine hohe Präzision der Motorbewegung Voraussetzung für ein sauberes Aufsammeln der gewünschten Objekte. Ein einzelner, gezielter Laserschuß (eventuell leicht defokussiert) schleudert das selektierte biologische Objekt 10 bzw. die Zelle in Strahlrichtung (Flugbahn 17) ins Auffanggefäß 18. Danach kann ein neues Objekt ausgeschnitten werden und der ganze Vorgang wiederholt sich.

Zur Beschleunigung des Sammelvorgangs können alle gewünschten Objekte zuerst mit dem Laser freipräpariert werden. Danach wird das Auffanggefäß 18 unter den Mikroskopisch gefahren. Die Mikroskopbühne fährt nacheinander die gespeicherten, 15 lasermikrodissekierten Objekte wieder an. Je ein Schuß befördert die einzelnen Objekte nacheinander in jeweils frische (neue) Auffanggefäß 18, Fig. 5, die koordiniert mit der Bewegung der Mikroskopbühne 3 weitertransportiert werden. Es können aber auch mehrere Objekte in einem Gefäß gesammelt werden.

Bei einem inversen Mikroskop (Fig. 6) kann ein klebendes Scheibchen (Klebefolie, Agar bestrichener Träger etc.), das wenige µm direkt über das ausgeschnittene Objekt geführt wird, zum Auffangen des wegkatapultierten Objektes verwendet werden. Dies kann z.B. eine Klebeklatsche 19 sein, die dann vom Robotarm 20 in ein geeignetes Gefäß (Fig. 7) geworfen wird, und der Robotarm 20 sucht sich ein neues Klebeteilchen (siehe Fig. 6).

Der Vorteil des Laser-induzierten Separationsprozesses von Zellen besteht in der gezielten und gleichzeitig schnellen Manipulation von einzelnen Zellen im Vergleich zum Stand der Technik. Aufgrund des einfachen Prinzips ist der Prozeß sehr robust und einfach zu handhaben und eignet sich daher zur computergestützten automatischen Separation einer Vielzahl von biologischen Objekten. Ein unter sicherheitstechnischen Aspekten wichtiger Vorteil liegt ferner darin, daß der Separationsprozeß in einem hermetisch abgeschlossenen System durchgeführt werden kann, so daß die

Umgebung von pathogenen Zellen geschützt werden kann. Außerdem werden die Zellen vor Verunreinigungen aus der Umgebung geschützt.

- Das Verfahren eignet sich prinzipiell zum Einsatz in Teilgebieten der Biotechnologie,
5 Molekularbiologie und Pathologie, wo spezifische Zelltypen angereichert werden sollen. Beispielsweise können mit dem Green fluorescent Protein (GFP) als Reporter-
gen transfizierte Zellen identifiziert werden. Marshall et al. (Neuron, Vol. 14, 211-215
10 (1995) benutzt z.B. die GFP-Methode, um die Expression von Ionenkanälen abzuschätzen. Gemäß einer weiteren Anwendung können für neurologische Experi-
mente aus Gehirngewebeschnitten z.B. Gliazellen separiert werden. Hierzu werden fluoreszenzmarkierte Antikörper benutzt, um die Zellen zu identifizieren. Zur Diag-
nose könnten aus Gewebeschnitten Tumorzellen, die z.B. durch morphologische Veränderungen auffallen, isoliert werden. Hierzu wird der Gewebeschnitt auf die
15 Trägerfolie gelegt. Die herauszupräparierende Zelle wird durch einen Schnitt durch das Gewebe und die Substratfolie separiert, so daß die Zelle - eventuell mit dem Substratmaterial - auf eine Unterlage transferiert wird. Diese Zellen werden anschließend histologisch analysiert. Darüber hinaus können Bakterien mit spezi-
fischen Eigenschaften wie z.B. Zitronensäureproduzenten auf ihre Leistungsfähigkeit hin durch geeignete pH-sensitive Farbumschläge eines geeigneten Indikators erkannt
20 und anschließend aussortiert werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Sortieren und zur Gewinnung von biologischen Objekten auf einem planaren Träger (2), auf dem sich die selektierten biologischen Objekte zusammen mit weiteren biologischen Objekten befinden, dadurch gekennzeichnet, daß ein Objektfeld (12) der Trägerfolie (2), auf dem sich das selektierte biologische Objekt (10) befindet, mit einem Laserstrahl (6) ausgeschnitten wird und durch einen laserinduzierten Transportprozeß auf ein unmittelbar oberhalb oder unterhalb der Trägerfolie (2) angeordnetes Auffängersubstrat (5) übertragen wird.
2. Verfahren zum Sortieren und zur Gewinnung von biologischen Objekten auf einem planaren Träger (2), auf dem sich die selektierten biologischen Objekte (10) zusammen mit weiteren biologischen Objekten befinden, dadurch gekennzeichnet, daß das selektierte biologische Objekt (10) von der umgebenden weiteren biologischen Masse durch einen Laserstrahl (6) entfernt wird, so daß das selektierte biologische Objekt (10) von seiner Umgebung freipräpariert ist, und daß anschließend das auf dem Träger (2) befindliche freipräparierte Objekt (10) durch einen weiteren Laser-Schuß/laserinduzierten Transportprozeß von dem Träger (2) zu einer Auffangvorrichtung (18, 19) wegkatapultiert wird (Flugbahn 17).
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Laserstrahl (6) auf einer geschlossenen, das Objektfeld (12) einschließenden Kurve um das biologische Objekt (10) herumgeführt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der das Objektfeld (12) einschließende Schnittbereich durch eine mit dem Laserstrahl (6) beleuchtete, auf die Trägerfolie (2) abgebildete Schlitzmaske simultan belichtet wird.

5

10

15

20

25

30

5. Verfahren nach Anspruch 1, 3 und 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Objektfeld (12) mit dem darauf befindlichen biologischen Objekt (10) nach dem Ausschneiden über eine Distanz von 0,5 bis 10 mm, vorzugsweise 1 bis 3 mm, zu dem angeordneten Auffängersubstrat (5) transportiert wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1 und 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Objektfeld (12) mit einem Durchmesser von mindestens 5 µm ausgeschnitten wird.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß zum Ausschneiden des Objektfeldes (12) ein UV-Laser (7) verwendet wird.
8. Verfahren nach Anspruch 1 und 3 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Trägerfolie (2) für die biologischen Objekte (1, 10) eine UV-Licht absorbierende Polymerfolie mit einer Dicke von 5 µm bis 15 µm verwendet wird.
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Polymer mindestens 5 Gew.-% eines aromatischen oder teilaromatischen Polykondensates enthält.
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Auffängersubstrat (5) eine Folie mit einer adhäsiven Oberfläche eingesetzt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Auffängersubstrat (5) eine Mikrotiterplatte mit 90 bis 500 Vertiefungen (Wells) zur Aufnahme der Proben verwendet wird.
- 25 12. Verfahren nach Anspruch 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die biologischen Objekte (1, 10) mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie erkannt und anschließend selektiert werden.

13. Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß biologische Objekte (1, 10) in Gewebeschnitten mit Hilfe histochemischer Farbreaktionen oder morphologischer visuell wahrnehmbarer Veränderungen erkannt und anschließend selektiert werden.

5

14. Verfahren nach Anspruch 1 und 3 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerfolie (2) mit den darauf befindlichen biologischen Objekten mit einem flüssigen, für die Laserstrahlung durchlässigen Nähr- oder Puffermedium beschichtet wird.

10

15. Verfahren nach Anspruch 1 und 3 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl die Trägerfolie (2) mit den zu sortierenden Objekten (1,10), als auch das Auffängersubstrat (5) in einem geschlossenen Behälter untergebracht sind, der ein UV-transparentes Fenster für den Laserstrahl besitzt.

15

16. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 2, gekennzeichnet durch

- eine Mikroskopieranordnung (14) zur Beobachtung von biologischen Objekten wie Gewebeschnitten auf einem Objektträger (2),

20

- eine Laseranordnung zur Erzeugung eines fokussierten Laserstrahls (6) zum Freipräparieren eines oder mehrerer selektierten biologischer Objekte (10) auf dem Objektträger (2), wobei Laseranordnung und Objektträger relativ zueinander verschieblich angeordnet sind, und

25

- eine Auffangvorrichtung (18 bzw. 19) in Richtung des Laserstrahls hinter dem Objektträger (2) zum Auffangen der selektierten Objekte (10), die nach dem Freipräparieren derselben durch einen laserinduzierten Transportprozeß (einen „Laser-Schuß“) vom Objektträger (2) auf die Auffangvorrichtung (18 bzw. 19) wegkatapultiert werden (Flugbahn 17).

30

Fig. 1

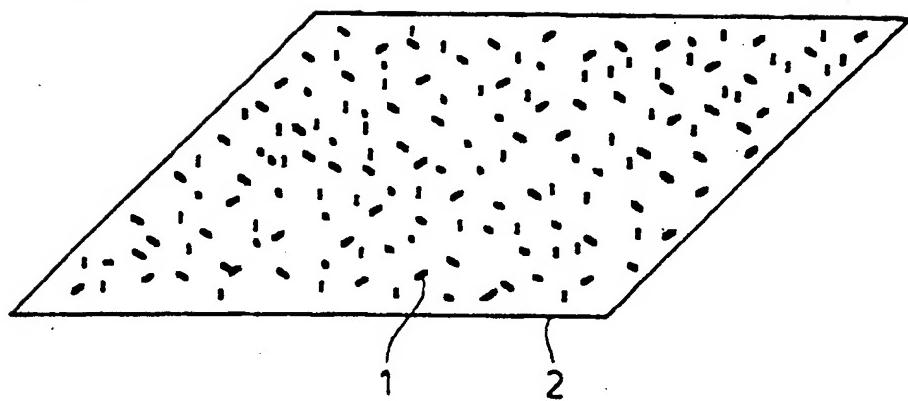
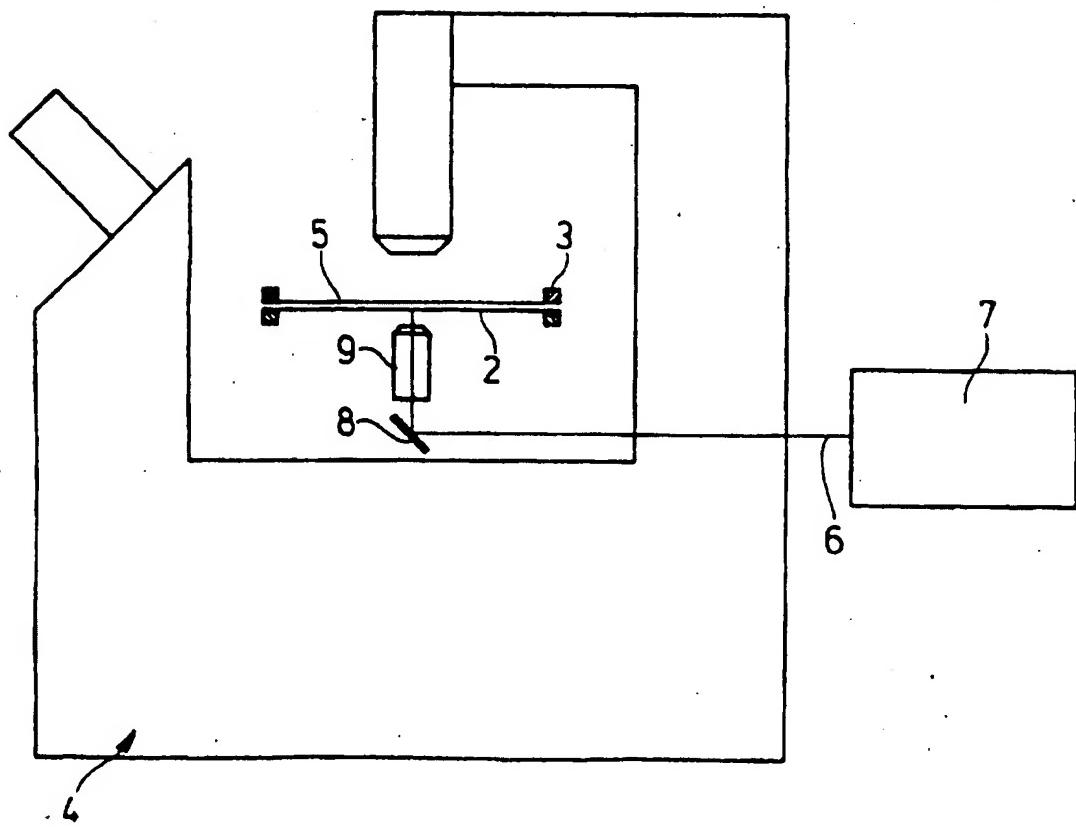


Fig. 2



„2/3“

Fig. 3

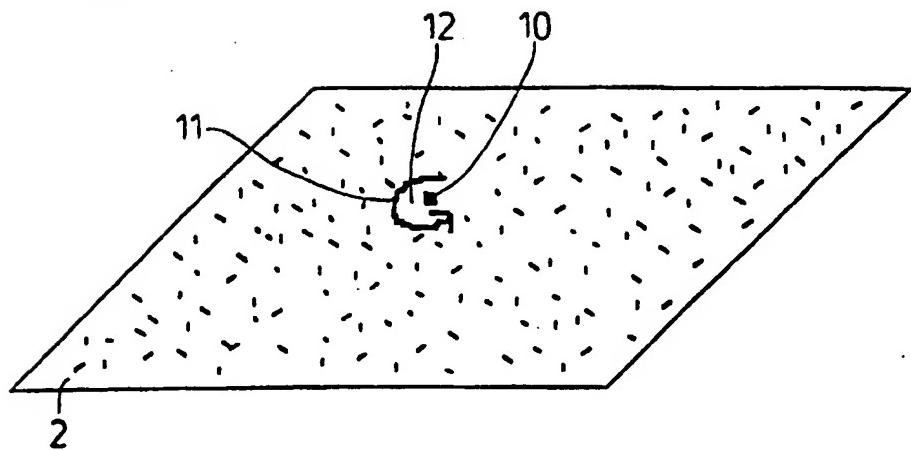
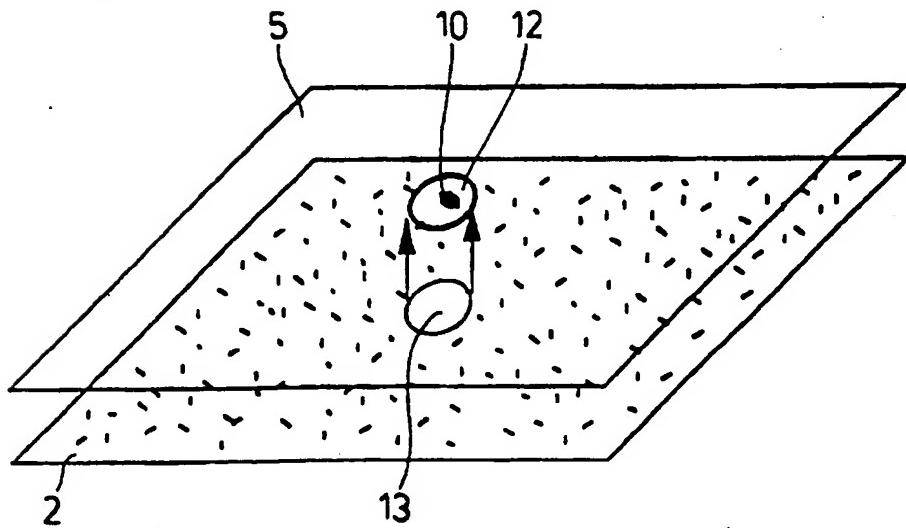


Fig. 4



„3 / 3“

Fig. 5

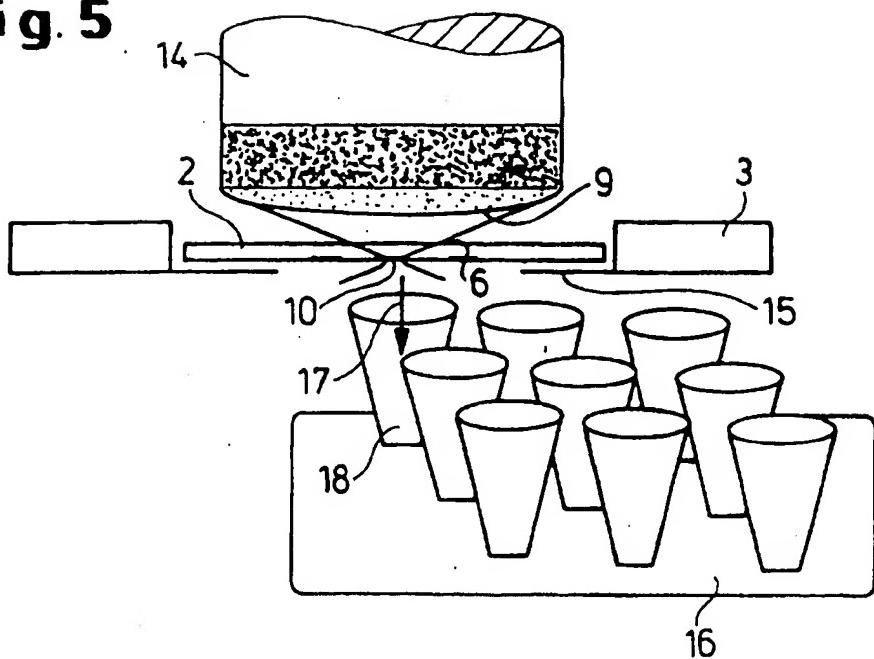


Fig. 6

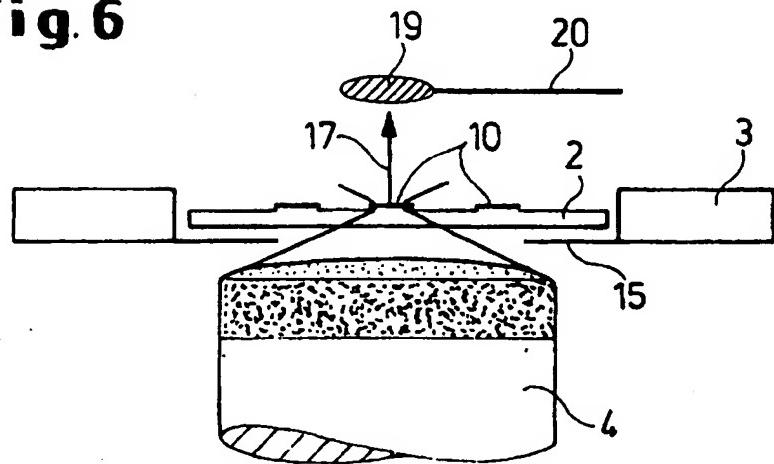
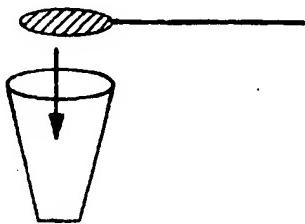


Fig. 7



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 G01N1/28 H05H3/04 G01N15/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 H05H G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF MICROSCOPY, vol. 107, May 1976, pages 19-24, XP000671562 ISENBERG G ET AL: "Cell surgery by laser micro-dissection: a preparative method" see page 20 - page 21 --- PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 394 (C-1088), 23 July 1993 & JP 05 076342 A (AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL), 30 March 1993, see abstract --- -/-	1-3,7, 14,16 2,16

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *A* document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

28 April 1997

Date of mailing of the international search report

14.05.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bindon, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 97/00361

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIOIMAGING, vol. 1, 1993, GB, pages 1-5, XP000671315 SUGIURA T ET AL: "Photon -pressure exertion on thin film and small particles in the evanescent field" see abstract ---	1
A	NATURE, vol. 368, 14 April 1994, LONDON GB, pages 667-669, XP000647487 SCHÜTZE KARIN ET AL: "Catch and move - cut or fuse" cited in the application see page 667 - page 669 ---	1,2,16
A	WO 95 23960 A (US HEALTH DEPARTMENT) 8 September 1995 see page 5, line 8 - page 7, line 17 ---	1,2,13
A	DE 43 00 698 A (SCHUETZE RAIMUND) 14 July 1994 see the whole document ---	1,2,16
A	WO 95 17656 A (COGEMA ;LAFFONT PIERRE (FR); DUMONT JEAN CLAUDE (FR)) 29 June 1995 see page 2, line 4 - page 5, line 28 -----	1,2,16

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/00361

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9523960 A	08-09-95	AU 1933795 A CA 2184245 A CN 1143413 A EP 0748439 A	18-09-95 08-09-95 19-02-97 18-12-96
DE 4300698 A	14-07-94	AU 671900 B AU 5883194 A BR 9405806 A CA 2153167 A WO 9416543 A EP 0679325 A JP 8505955 T	12-09-96 15-08-94 19-12-95 21-07-94 21-07-94 02-11-95 25-06-96
WO 9517656 A	29-06-95	FR 2714464 A	30-06-95

A. Klassifizierung des Anmeldungsgegenstandes
 IPK 6 G01N1/28 H05H3/04 G01N15/14

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
 IPK 6 H05H G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	JOURNAL OF MICROSCOPY, Bd. 107, Mai 1976, Seiten 19-24, XP000671562 ISENBERG G ET AL: "Cell surgery by laser micro-dissection: a preparative method" siehe Seite 20 - Seite 21 ---	1-3,7, 14,16
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 394 (C-1088), 23.Juli 1993 & JP 05 076342 A (AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL), 30.März 1993, siehe Zusammenfassung ---	2,16

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

INTERNATIONALER RECHERCHEBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/00361

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BIOIMAGING, Bd. 1, 1993, GB, Seiten 1-5, XP000671315 SUGIURA T ET AL: "Photon -pressure exertion on thin film and small particles in the evanescent field" siehe Zusammenfassung ---	1
A	NATURE, Bd. 368, 14.April 1994, LONDON GB, Seiten 667-669, XP000647487 SCHÜTZE KARIN ET AL: "Catch and move - cut or fuse" in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 667 - Seite 669 ---	1,2,16
A	WO 95 23960 A (US HEALTH DEPARTMENT) 8.September 1995 siehe Seite 5, Zeile 8 - Seite 7, Zeile 17 ---	1,2,13
A	DE 43 00 698 A (SCHUETZE RAIMUND) 14.Juli 1994 siehe das ganze Dokument ---	1,2,16
A	WO 95 17656 A (COGEMA ;LAFFONT PIERRE (FR); DUMONT JEAN CLAUDE (FR)) 29.Juni 1995 siehe Seite 2, Zeile 4 - Seite 5, Zeile 28 -----	1,2,16

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9523960 A	08-09-95	AU	1933795 A	18-09-95
		CA	2184245 A	08-09-95
		CN	1143413 A	19-02-97
		EP	0748439 A	18-12-96
-----	-----	-----	-----	-----
DE 4300698 A	14-07-94	AU	671900 B	12-09-96
		AU	5883194 A	15-08-94
		BR	9405806 A	19-12-95
		CA	2153167 A	21-07-94
		WO	9416543 A	21-07-94
		EP	0679325 A	02-11-95
		JP	8505955 T	25-06-96
-----	-----	-----	-----	-----
WO 9517656 A	29-06-95	FR	2714464 A	30-06-95
-----	-----	-----	-----	-----